

# HERRAMIENTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS EN UN SISTEMA BIOLÓGICO.

R. A. Jaime-Infante\*, Z. Hernández Martínez\*, J. Triana-Dopico\*, O. Fosado Tellez\*, A. Montagud Aquino\*\*, D. Gamermann\*\*, P. Fernández de-Córdoba-Castellá\*\*, J. F. Urchueguía-Schölzel\*\*<sup>1</sup>

\*Grupo InterTech-UPR. Universidad de Pinar del Río “Hermanos Saíz Montes de Oca”, Cuba.

\*\*Grupo InterTech-Valencia. Universidad Politécnica de Valencia, España.

## ABSTRACT

Currently, the *in silico* calculation of intracellular fluxes in biological systems is a widely used tool in Systems Biology. This method is based on the hypothesis that these systems work optimally with respect to certain biological criteria. Jointly, they are considered a set of constraints that pass since the imposition of a steady-state to the system, until physicochemical and experimental constraints. These elements allow, through linear programming models, to obtain a vector space that containing metabolic fluxes in a biochemical reactions networks. The solutions of these generated models permit the simulation of the metabolic flux distributions to maximize or minimize an objective function in a biological system. In this sense we developed HYDRA: Flux Balance Analysis, that it is a computer tool, than using the algorithm Simplex Reviewed, solves the constructed models and generate output reports that constitute an important tool for making decisions in System Biology.

**KEYWORDS:** Flux Balance Analysis, Genome-scale metabolic models, Metabolic Fluxes, Linear Programming.

**MSC:** 90C05

## RESUMEN

Actualmente el cálculo *in silico* de los flujos intracelulares en los sistemas biológicos constituye una herramienta muy usada en Biología de Sistemas. Este método se basa en la hipótesis de que estos sistemas funcionan de forma óptima respecto a cierto criterio biológico. Conjuntamente son consideradas restricciones que pasan, desde la imposición de un estado estacionario al sistema, hasta restricciones físico-químicas y experimentales. Estos elementos permiten obtener, a través de modelos de programación lineal, un espacio vectorial que contienen los flujos metabólicos en una red de reacciones bioquímicas. La solución de estos modelos generados, permite simular las distribuciones de flujo metabólicos al maximizar o minimizar una función objetivo en un sistema biológico. En este sentido se desarrolló HYDRA: Flux Balance Analysis, que es una herramienta informática que, utilizando el algoritmo Simplex Revisado, soluciona los modelos construidos y genera informes de salida que constituyen importante herramienta para la toma de decisiones en la Biología de Sistema.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los flujos metabólicos, como representación de las velocidades de las reacciones químicas en un sistema biológico, pueden ser calculados *in silico* bajo la hipótesis de que estos sistemas trabajan de forma óptima respecto a cierto criterio biológico. Las capacidades y distribuciones de flujos de una red bioquímica han sido predichas utilizando varios métodos de optimización. Un ejemplo lo constituye el análisis basado en programación lineal conocido como: Análisis del Balance de Flujos (FBA, del inglés *Flux Balance Analysis*) (Edwards *et al.*, 1999; Varma and Palsson, 1993; Lee *et al.*, 2006). Este método requiere solo del modelo estequiométrico de la red metabólica, conocidos como modelos metabólicos a escala genómica. No obstante, como el sistema lineal de ecuaciones que describe el balance de masas en estado estacionario es, en general, compatible indeterminado, se deben definir criterios y restricciones apropiadas para encontrar un espacio solución único (Orth *et al.*, 2010).

El FBA ha sido ampliamente utilizado en el estudio del comportamiento metabólico de redes bioquímicas, y aplicado en varios diseños de ingeniería metabólica (Duarte *et al.*, 2007; Feist *et al.*, 2007;

<sup>1</sup> [ramon@info.upr.edu.cu](mailto:ramon@info.upr.edu.cu) (corresponsal), [zenen85@mat.upr.edu.cu](mailto:zenen85@mat.upr.edu.cu), [jtriana@vrect.upr.edu.cu](mailto:jtriana@vrect.upr.edu.cu), [fosado@mat.upr.edu.cu](mailto:fosado@mat.upr.edu.cu), [armontag@mat.upv.es](mailto:armontag@mat.upv.es), [daniel.gamermann@ucv.es](mailto:daniel.gamermann@ucv.es), [pfernandez@mat.upv.es](mailto:pfernandez@mat.upv.es), [jfurchueguia@fis.upv.es](mailto:jfurchueguia@fis.upv.es).

Feist *et al.*, 2009). Generalmente los modelos metabólicos son construidos en diversos formatos, de modo que se pueda jerarquizar la información y llevar a cabo un análisis más preciso, sin embargo estos formatos no son requisitos del FBA. Así, la información biológica puede presentarse en lenguajes de marca como por ejemplo el SBML (del inglés, *System Biology Markup Language*) (Hucka *et al.*, 2003) o en prototipos de textos como el OptGene (Patil *et al.*, 2005; Cvijovic *et al.*, 2010).

Este método permite predecir con cierta aproximación valores óptimos de funciones objetivos biológicas. Las funciones objetivos pueden adoptar muchas formas, incluyendo los objetivos fisiológicos más importantes, así como los objetivos de diseño para un sistema dado. Las funciones más comunes incluyen el máximo del crecimiento celular (Edwards *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2002), la maximización de la producción de ATP (por sus siglas de Adenosín Trifosfato), nucleósido que constituye la fuente de energía para la mayoría de reacciones químicas que tienen lugar en las células, la maximización de la tasa de síntesis de un producto en particular (Orth *et al.*, 2010), entre otras. Otras funciones objetivos incluyen la minimización de la producción de ATP con el fin de determinar las condiciones de máxima eficiencia de energía metabólica, y minimizar la absorción de nutrientes con el fin de evaluar las condiciones, en virtud de la cual una célula puede realizar sus funciones metabólicas, consumiendo la cantidad mínima de nutrientes (Lee *et al.*, 2006).

En este reporte se presenta la herramienta HYDRA: Flux Balance Análisis (HYDRA: FBA), en la que se utiliza un algoritmo de programación lineal, específicamente el método simplex revisado, en el cual también se utilizaron las reglas lexicográficas para su correcto funcionamiento y evitar de esa manera los ciclos infinitos que pudieran entorpecer el funcionamiento óptimo del algoritmo. De esta forma, y a partir de la información biológica contenida en estándares como SBML (Hucka *et al.* 2003) y OptGene (Cvijovic *et al.*, 2010), se puede calcular la distribución de flujos de un sistema biológico optimizando una función objetivo en particular.

## 2. RESULTADOS

### 2.1 Fundamentos teóricos del Análisis del Balance de Flujos

Varios han sido los protocolos para la reconstrucción y análisis de modelos metabólicos a escala genómica (Thiele y Palsson, 2010; Triana *et al.*, 2012). Estos modelos pueden ser corregidos, depurados y validados mediante la comparación del conjunto de salida del FBA (distribución de flujos metabólicos) con datos experimentales reportados en la literatura. Este aspecto es de gran importancia ya que se pueden generar modelos de predicción a gran escala expuestos a diferentes condiciones (Orth *et al.*, 2010).

Todos los fenotipos expresados por un sistema biológico deben satisfacer restricciones básicas que se imponen a las funciones de todas las células. Estas restricciones pueden ser fisicoquímicas, topológicas, medioambientales, etc. En pocas palabras, las limitaciones fisico-químicas se enmarcan dentro de leyes físicas como la conservación de la masa y la energía, las topológicas representan restricciones de espacio de los metabolitos dentro de los compartimentos celulares y las limitaciones ambientales se circunscriben a la disponibilidad de nutrientes, valores pH y temperatura, etc., que varían con el tiempo y el espacio. Estas limitaciones pueden ser descritas matemáticamente y el conjunto de posibles soluciones a estas descripciones matemáticas proporciona una gama de estados válidos para el sistema biológico (Orth *et al.*, 2010). Adicionalmente, los algoritmos matemáticos pueden ser utilizados para evaluar la respuesta de los sistemas biológicos ante diversas perturbaciones, tales como: diferentes objetivos celulares, la variabilidad en las restricciones impuestas, eliminación o adición de genes metabólicos implicados en vías metabólicas de síntesis o degradación de interés industrial (Lee *et al.*, 2006).

#### 2.1.1 Formulación básica

El primer paso para realizar este tipo de análisis es la reconstrucción de una red bioquímica. El proceso de reconstrucción se inicia con la anotación del genoma secuenciado, en el que se identifican los genes que codifican a las proteínas que catalizan las reacciones dentro de la red. Después de la reconstrucción inicial se pueden identificar las enzimas faltantes de la red a través de la experimentación adicional, como parte de un proceso iterativo de refinamiento del modelo (Förster *et al.*, 2003). En la Figura 1 se muestra una red de reacciones hipotéticas, la cual será utilizada para ilustrar el proceso de análisis posterior. La red metabólica en su conjunto puede ser representada en una matriz (S). Esta matriz está compuesta por los coeficientes estequiométricos (cantidad de sustancia que teóricamente reaccionan y que se obtienen) de cada una de las reacciones de la red bioquímica. Las filas de S corresponden a los metabolitos, y las columnas de S corresponden a las reacciones. Por ejemplo, en la Figura 1, la red tiene 5 metabolitos y 11 reacciones, formando una matriz S, de 5 filas por 11 columnas. Los elementos negativos de la matriz representan el consumo de los metabolitos y los valores positivos denotan la producción. Por ejemplo, la

primera columna, describe una reacción (R1) en la que 1 mol de A se produce (+1), en la segunda columna (R2) se consume 1 mol de A (-1) y 1 mol de C se produce (+1). De esta forma se va representando matricialmente cada una de las reacciones descritas (Lee *et al.*, 2006)



## II- Formulación FBA

Ecuación del Balance de Masas.

$$\frac{dC}{dt} = Sv$$

C: Concentración de Metabolitos.  
t: Tiempo.  
S: Matriz Estequiométrica.  
v: Vector de Flujos Metabólicos.

Estado Estacionario.

$$Sv = 0$$

Formulación LP.

Objetivo: Max Z = v10

Restriciones:

$$\begin{matrix} & R1 & R2 & R3 & R4 & R5 & R6 & R7 & R8 & R9 & R10 & R11 \\ \begin{matrix} A \\ B \\ C \\ D \\ E \end{matrix} & \begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & -2 & 0 \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} R1 \\ \vdots \\ R11 \end{bmatrix} \end{matrix} = 0$$

$0 \leq v1, \dots, v11 \leq 10$

Z = 10  
V = [10, 10, 0, 0, 10, 0, 10, 0, 0, 10, 0]

**Figura 1.** Representación de una red de reacciones y el Análisis del Balance de Flujos (FBA).

Matemáticamente, la matriz estequiométrica es una transformación lineal del vector de los flujos:  $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)$ , en un vector de la derivada de la concentración de los metabolitos en el tiempo  $x = (x_1, x_2, \dots, x_m)$ , expresado como:

$$\frac{dx}{dt} = S * v \quad (1)$$

Esta ecuación representa la ecuación fundamental del balance dinámico de masa que caracteriza todos los estados funcionales en la red de reacciones bioquímicas. El balance de masa se define en términos del flujo metabólico a través de cada reacción y su estequiometría. Donde  $v$  representa el vector de los flujos con los elementos correspondientes a los flujos en las reacciones dadas (columnas) en  $S$ .

Cada ecuación individual en el conjunto

$$\frac{dx_i}{dt} = \sum_k S_{ik} * v_k \quad (2)$$

representa la sumatoria de todos los flujos  $v_k$  que forman el metabolito  $x_i$  y aquellos que lo degradan. Existen cuatro subespacios vectoriales fundamentales asociados a la matriz. Estos subespacios juegan un papel importante en el análisis de la red de reacciones bioquímicas. El vector producido es una transformación lineal en los dos espacios ortogonales (la columna y el espacio nulo de la izquierda) llamado el dominio, siendo trazado el vector en los dos espacios ortogonales (la fila y el espacio nulo), llamado el codominio o el rango de la transformación.

Este método asume que el sistema analizado funciona bajo la hipótesis del estado estacionario, donde la cantidad de un metabolito ( $x_i$ ) en todas las reacciones no varía en el tiempo ( $t$ ). El estado estacionario asumido por lo tanto, elimina la derivada en el tiempo en la ecuación (1), dando:

$$S \cdot v = 0 \quad (3)$$

Este balance de masa representa la principal restricción en el FBA. Esta limitación físico-químicas por sí misma representa un conjunto de ecuaciones lineales donde el número de ecuaciones (una por cada metabolito) es mucho menor que el número de variables desconocidas (los flujos de cada reacción). En consecuencia, este conjunto de ecuaciones lineales se encuentra indeterminado. Otras restricciones físico-químicas, tales como la reversibilidad de las reacciones y la energía necesaria para el mantenimiento de células, así como restricciones experimentales son impuestas en el modelo matemático (Orth *et al.*, 2010). Por lo tanto, el FBA, implica la optimización de un objetivo celular concreto. Las funciones objetivo utilizadas en la práctica tienen una forma lineal:

$$Z = c \cdot v \quad (4)$$

Donde  $c$  denota el vector que define los coeficientes o pesos para cada uno de los flujos en  $v$ . Esta representación general de  $Z$ , en donde los elementos de  $c$  pueden ser manipulados, permite la formulación de una serie de objetivos diversos. La estrategia de optimización empleada por el FBA intenta encontrar una solución  $v$  que optimiza  $Z$ , en el espacio de solución acotado y definido por el conjunto de limitaciones físico-químicas. Teniendo que tanto la función objetivo  $Z$  como el conjunto de restricciones son lineales, el FBA constituye un problema de programación lineal (LP) que puede ser implementado en un entorno computacional, incluso para los sistemas a gran escala (Orth *et al.*, 2010). Este problema puede ser formulado en sentido general a través del siguiente modelo matemático:

$$\begin{aligned} & \text{Max } (Z = c \cdot v) \\ & \text{sujeto a } S \cdot v_j = 0 \quad \forall j \in N \\ & v_i, \text{ irr} \in \mathbb{R}^+ \\ & v_i, \text{ rev} \in \mathbb{R} \\ & v_j \in \mathbb{R}, v_{\min} \leq v_j \leq v_{\max} \end{aligned}$$

donde  $v_j$  es la velocidad de la  $j$  reacción. Los elementos del vector de flujo  $v$  son restringidos para la definición de las reacciones reversibles e irreversibles,  $v_i, \text{ rev}$  y  $v_i, \text{ irr}$ , respectivamente. Además, es establecido un conjunto de ecuaciones,  $v_{i+}$ , que constituyen las reacciones metabólicas restringidas que son forzadas por valores determinados experimentalmente y reportados en la literatura (Edwards *et al.*, 1999).

## 2.2 Diseño de la aplicación

La aplicación de escritorio **HYDRA: Flux Balance Analysis**, fue desarrollada usando C#.net (Archer, 2002) como lenguaje de programación y la librería GlpkSharp (Url 1), las cuales se ejecutan sobre el framework 4.0 de .NET.

Entre las capacidades o condiciones que el sistema debe cumplir, se plantearon los siguientes:

- Seleccionar el modelo a estudiar.
- Leer la información de un fichero SBML nivel 2 versión 1.
- Leer la información de un fichero OptGene.
- Mostrar la información del modelo a gestionar.
- Gestionar la información del modelo.
- Modificar las restricciones del organismo.
- Gestionar metabolitos.
- Realizar el FBA.
- Mostrar el peso de los metabolitos en el organismo.
- Exportar los resultados del FBA.
- Exportar el modelo en SBML con los cambios que se le impusieron para realizar el FBA.
- Exportar el modelo en formato OptGene con los cambios que se le impusieron para realizar el FBA.

Para el cumplimiento de estas capacidades no se utilizó un sistema gestor de base datos sino documentos XML (del inglés, *Extensible Markup Language*), y también se utilizó un estándar en texto plano ya que

son los orígenes de datos más usados en la Biología de Sistemas, a continuación se ofrecen detalles al respecto.

### 2.2.1 Orígenes de datos.

El sistema fue diseñado con la capacidad de reconocer dos orígenes de datos muy usados por la comunidad científica. Por un lado, los archivos SBML nivel 2 versión 1 (Hucka *et al.*, 2003), usados para una mejor comprensión por los softwares computacionales por su estándar bien definido y su basamento en XML. Adicionalmente, se tuvo en cuenta la lectura de archivos en formato OptGene (archivos con extensión .txt), ya que ha sido uno de los más generalizado y usados por los especialistas (Patil *et al.*, 2005; Cvijovic *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Interface Gráfica de HYDRA: Flux Balance Analysis

La aplicación permite mostrar de forma sencilla la información general contenida en el fichero que se toma como origen de datos, tal como se puede ver en la figura 2. Esta información comprende el nombre del modelo, el identificador (id), los compartimentos, los metabolitos o especies y las reacciones que componen la red. Adicionalmente, se brinda la opción, a través de un explorador en la parte izquierda de la interfaz, de seleccionar y acceder a la información más específica de cada uno de estos elementos anteriormente mencionados. En el caso de la lista de reacciones podrán ser modificados los límites inferiores o superiores de aquellas reacciones seleccionadas.

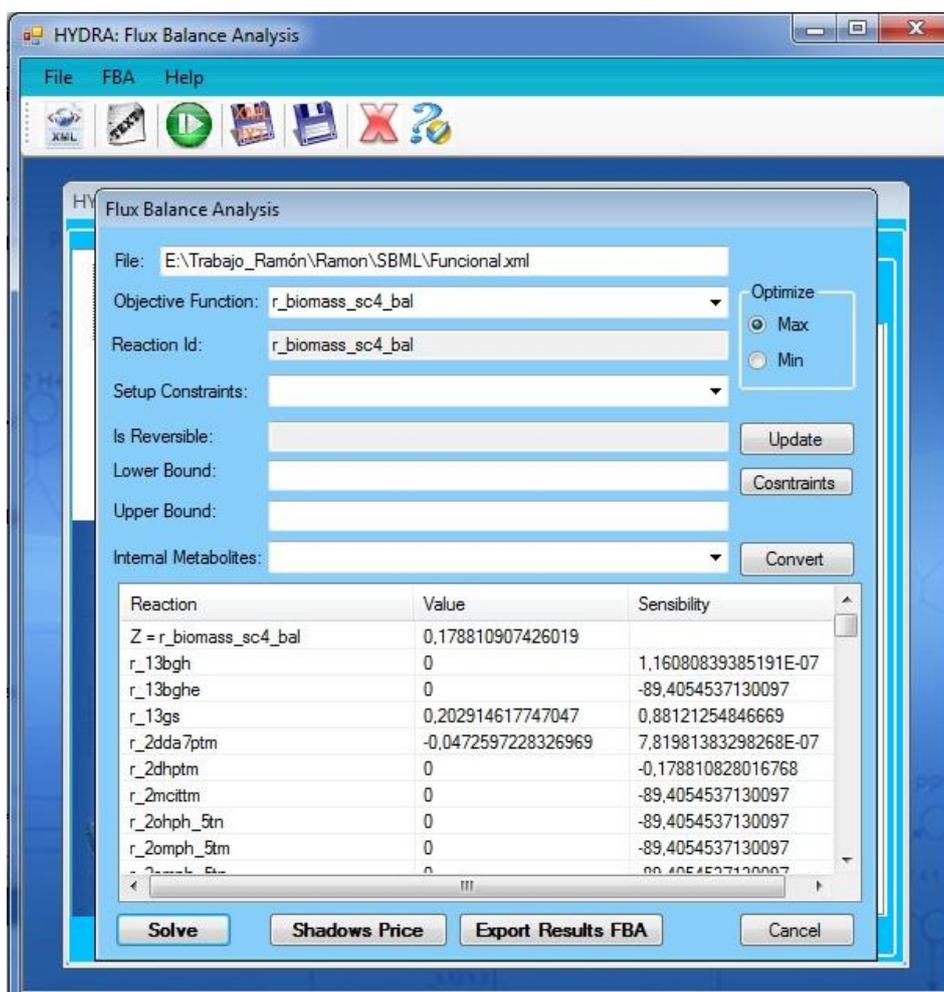


Figura 2. Información general contenida en el fichero que se toma como origen de datos.

Posteriormente se pasa a elegir diferentes opciones que brinda el sistema, como:

1. Elegir la reacción que se desea maximizar o minimizar.
2. Convertir algunos de los metabolitos internos del sistema, en metabolitos externos.
3. Cambiar y actualizar las restricciones en un rango deseado siempre y cuando cumplan con las condiciones de reversibilidad de cada de las reacciones.
4. Exportar los resultados del FBA.

En la aplicación se permite calcular la distribución de flujos de los modelos metabólicos analizados y los precios sombras de cada una de las reacciones con respecto a la función objetivo (Figura 3).



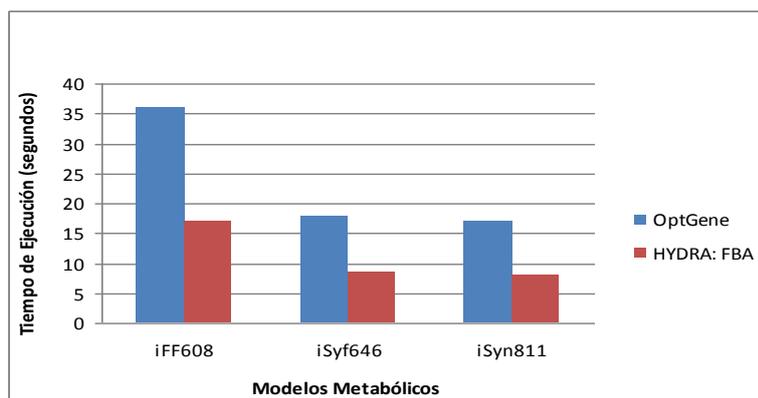
**Figura 3.** Interfaz donde se visualiza los resultados del cálculo de la sensibilidad de flujos y la distribución de flujos calculada.

### 2.3 Diferencias con otras aplicaciones afines.

HYDRA: Flux Balance Analysis es una aplicación intuitiva, sencilla y amigable al usuario, en ella se unen varias funcionalidades comúnmente separadas y asociadas inherentemente a las herramientas convencionales. Ejemplo de ello es el trabajo a partir de orígenes de datos en formato SBML y OptGene. Esta funcionalidad es novedosa en las herramientas existentes, sobre todo por el uso global e independiente de estos orígenes de datos. Adicionalmente, nuestra propuesta permite ajustar los parámetros necesarios y guardarlos sin tener que acudir a editores de textos algo que no ocurre en los software precedentes. Este aspecto es muy útil debido a que se optimiza el tiempo de corrección y ajuste de los modelos junto al tiempo de ejecución. La aplicación pretende ser versátil pues permite, una vez cargado el modelo, convertir metabolitos externos a internos y viceversa, dando así la posibilidad de realizar mayor cantidad de análisis *in situ*. Otra diferencia es que se posibilita exportar el modelo en SBML y OptGene con los cambios que se le impusieron para realizar el FBA, además de guardar en un fichero con extensión .txt, los resultados del vector de flujos metabólicos.

Con el interés de realizar una simple comparación en cuanto al tiempo de ejecución (definido como el tiempo de ejecución del algoritmo junto con el tiempo de exportación del fichero que contiene el vector de los flujos) se realizó una simulación del crecimiento de tres modelos metabólicos utilizando el paquete OptGene y la aplicación presentada en nuestro trabajo. En la figura 4 se presenta un gráfico con los resultados del tiempo de ejecución de la simulación *in silico* del crecimiento de la biomasa de los modelos metabólicos de *Saccharomyces cerevisiae* (iFF608) (Förster *et al.*, 2003), *Synechococcus elongatus* PCC7942 (iSyf646) (Triana *et al.*, 2012) y *Synechocystis* PCC6803 (iSyn811) (Montagud *et*

al., 2011). Para ello se usó un ordenador con procesador Pentium Dual Core y 2 Gigabyte de RAM (Memoria de Acceso Aleatorio).



**Figura 4.** Tiempo de ejecución (en segundos) de la simulación del crecimiento de la biomasa de tres modelos metabólicos publicados, utilizando los softwares OptGene y HYDRA: FBA.

Los resultados mostrados en esta figura demuestran la eficiencia en cuanto a tiempo de ejecución y usabilidad de nuestra herramienta. Se puede apreciar que esta variable disminuyó aproximadamente a la mitad en comparación con las simulaciones realizadas por el OptGene. Este aspecto puede ser racional teniendo en cuenta la magnitud de la información contenida en los modelos metabólicos analizados.

#### 2.4 Enfoque aplicativo de HYDRA: Flux Balance Analysis

Varios estudios han demostrado que las técnicas de optimización lineal son muy útiles para el análisis de las capacidades metabólicas celulares. Desde que la reconstrucción de redes metabólicas a escala genómica se ha convertido en una poderosa herramienta para el análisis de la biología de sistemas, muchos investigadores han dirigido su interés a este campo para obtener beneficios económicos. Un enfoque económicamente atractivo para trabajar con modelos metabólicos a gran escala es el análisis de las modificaciones genéticas introducidas en los sistemas biológicos y analizadas por el FBA. Estos estudios han permitido el desarrollo de estrategias de ingeniería genética en sistemas microbianos para mejorar la producción de diversos productos biológicos (Kim *et al.*, 2012). Hay muchos ejemplos de investigaciones exitosas donde los microorganismos se utilizan como plataforma de síntesis biológica. Muchos de ellos han surgido y llevado a cabo a través de métodos *in silico* de ingeniería metabólica soportados en un inicio por las predicciones basadas en técnicas de optimización lineal. A pesar del hecho de que las aplicaciones de los modelos metabólicos se encontraron inicialmente en la implementación de diseños de ingeniería metabólica, no es menos cierto que sus beneficios en otros campos han sido particularmente importantes. Entre estos podemos señalar la comprensión de las características de los patógenos microbianos y su modo de acción, las aplicaciones en el campo de la biomedicina y de la industria farmacéutica, la bioenergía, por mencionar algunos; para lo cual constituye este sistema informático una herramienta de gran ayuda y un aporte a la solución de esta problemática.

### 3 CONCLUSIONES

La reconstrucción del genotipo metabólico de un sistema biológico en un modelo *in silico*, es considerado actualmente una importante tecnología para aplicaciones industriales. La aplicación HYDRA: Flux Balance Analysis simula los flujos metabólicos como representación de las velocidades de las reacciones químicas en sistemas biológicos bajo la hipótesis de que estos sistemas trabajan de forma óptima respecto a cierto criterio biológico. En este artículo mostramos los procedimientos matemáticos que sigue la aplicación, programada sobre algoritmos de programación lineal, obteniendo una herramienta intuitiva y útil en la que se unen varias funcionalidades comúnmente separadas en las herramientas convencionales.

RECEIVED MAY, 2013  
REVISED JANUARY, 2014

### REFERENCIAS

- [1] ARCHER T. (2002): **A Fondo C#**. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A., 1st Edition, 2002. ISBN 8448132467.
- [2] CVIJOVIC M, OLIVARES-HERNÁNDEZ R, AGREN R, et al. (2010): BioMet Toolbox, genome-wide analysis of metabolism. **Nucleic acids research**, 38,144-149.
- [3] EDWARDS J. S, IBARRA R. U and PALSSON B. Ø. (2001): *In silico* predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. **Nat Biotechnol**, 19, 125-130.
- [4] DUARTE NC, BECKER SA, JAMSHIDI N, et al. (2007): Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. **ProcNatlAcadSciUSA**, 104, 1777–1782.
- [5] EDWARDS J.S, RAMAKRISHNA R, SCHILLING C.H, PALSSON B.Ø. (1999): Metabolic flux balance analysis. In, **Metabolic Engineering Edited** by Lee SY, Papoutsakis E. T, 13-57.
- [6] FEIST A.M, HENRY C.S, REED J.L, et al. (2007): A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. **Molecular systems biology**, 3,121.
- [7] FEIST A.M, HERRGÅRD M.J, THIELE I, REED J.L, PALSSON B.Ø. (2009): Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. **Nature reviews. Microbiology**, 7,129-143.
- [8] FÖRSTER J, FAMILI I, FU P, PALSSON B.Ø and NIELSEN J. (2003): Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. **Genome Research**, 13, 244-253.
- [9] HUCKA M, FINNEY A, SAURO H.M, et al. (2003): The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. **Bioinformatics**, 19,524–531.
- [10] IBARRA R.U, EDWARDS J.S and PALSSON B.Ø. (2002): *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth. **Nature**, 420, 186-189.
- [11] KIM T.Y, SEUNG B. S, YU B.K, WON J.K and SANG Y.L (2012): Recent advances in reconstruction and applications of genome-scale metabolic models. **Current Opinion in Biotechnology**, 23, 617-623.
- [12] LEE J.M, GIANCHANDANI E.P and PAPIN J.A. (2006): Flux balance analysis in the era of metabolomics. **Briefings in Bioinformatics**, 7, 140-150.
- [13] MONTAGUD A, ZELEZNIAK A, NAVARRO E, et al. (2011): Flux coupling and transcriptional regulation within the metabolic network of the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Biotechnology Journal**, 6, 330-342.
- [14] ORTH J.D, THIELE I and PALSSON B.Ø. (2010): ¿What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, 28, 245-248.
- [15] PATIL KR, ROCHA I, FÖRSTER J and NIELSEN J. (2005): Evolutionary programming as a platform for *in silico* metabolic engineering. **BMC Bioinformatics**, 6, 308.
- [16] THIELE I, and PALSSON BO. (2010): A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. **NatProtocols**, 5, 93.
- [17] TRIANA J, MONTAGUD A, SIURANA M, GAMERMANN D, TORRES J, TENA J, FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA P and URCHUEGUÍA J.F. (2012): Reconstruction procedure to generate and evaluate genome-scale metabolic network models, use of *Synechococcus elongatus* PCC7942 as a case study. Summited at **Metabolic Network Reconstruction for the series Methods in Molecular Biology**. Springer, Berlin. Url1. Recuperado en febrero de 2012, de Windows binaries for the GNU Linear Programming Kit (GLPK): <http://sourceforge.net/projects/winglpk/>
- [18] VARMA A and PALSSON B.. (1993): Metabolic capabilities of *E. coli* II. Optimal growth patterns. **Journal of Theoretical Biology**, 165,503-522.